

日本特許庁
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

4

26.05.00
JP00/3413

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application:

1999年 6月 2日

REC'D 27 JUL 2000

WIPO

PCT

出願番号
Application Number:

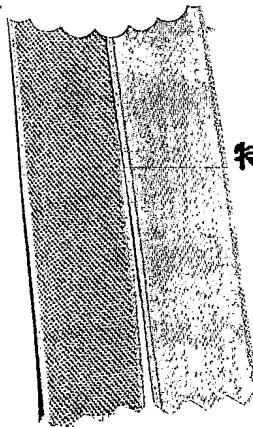
平成11年特許願第155198号

出願人
Applicant(s):

株式会社ベッセルリサーチ・ラボラトリー

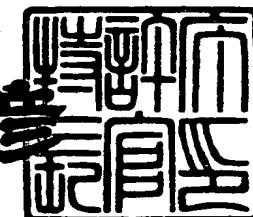
**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

近藤 隆彦



2000年 6月 29日

出証番号 出証特2000-3049117

【書類名】 特許願

【整理番号】 99P0004

【提出日】 平成11年 6月 2日

【あて先】 特許庁長官 伊佐山 建志 殿

【国際特許分類】 G01N 33/53

【発明の名称】 安定化ヒト変性リポタンパク質およびその製造方法

【請求項の数】 9

【発明者】

【住所又は居所】 東京都町田市旭町3丁目6番6号 株式会社ベッセルリ
サーチ・ラボラトリーエ内

【氏名】 重松 貴

【発明者】

【住所又は居所】 東京都町田市旭町3丁目6番6号 株式会社ベッセルリ
サーチ・ラボラトリーエ内

【氏名】 島村 京子

【発明者】

【住所又は居所】 東京都町田市旭町3丁目6番6号 株式会社ベッセルリ
サーチ・ラボラトリーエ内

【氏名】 木村 順治

【特許出願人】

【識別番号】 592246875

【氏名又は名称】 株式会社ベッセルリサーチ・ラボラトリ

【代理人】

【識別番号】 100072349

【弁理士】

【氏名又は名称】 八田 幹雄

【電話番号】 03-3230-4766

【選任した代理人】

【識別番号】 100102912

【弁理士】

【氏名又は名称】 野上 敦

【選任した代理人】

【識別番号】 100110995

【弁理士】

【氏名又は名称】 奈良 泰男

【選任した代理人】

【識別番号】 100111464

【弁理士】

【氏名又は名称】 齋藤 悅子

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 001719

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 安定化ヒト変性リポタンパク質およびその製造方法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ヒトリポタンパク質を人工的に変性させ、変性リポタンパク質を得、該変性リポタンパク質を凍結乾燥することにより該変性リポタンパク質を安定化することからなる安定化ヒト変性リポタンパク質の製造方法。

【請求項2】 該リポタンパク質がカイロミクロン、VLDL、LDL、Lp (a)、HDL 2 及びHDL 3 からなる群より選ばれる少なくとも一種である、請求項1に記載の安定化ヒト変性リポタンパク質の製造方法。

【請求項3】 該変性リポタンパク質がヒトリポタンパク質を金属イオンの存在下で酸化することによって得られる、請求項1または2に記載の安定化ヒト変性リポタンパク質の製造方法。

【請求項4】 該金属イオンが銅イオン、鉄イオンまたはこれらの混合物である、請求項3に記載の安定化ヒト変性リポタンパク質の製造方法。

【請求項5】 該変性リポタンパク質がヒトリポタンパク質をアセチル化することによって得られる、請求項1または2に記載の安定化ヒト変性リポタンパク質の製造方法。

【請求項6】 該変性リポタンパク質がヒトリポタンパク質をマロンジアルデヒドを用いてアルデヒド化することによって得られる、請求項1または2に記載の安定化ヒト変性リポタンパク質の製造方法。

【請求項7】 凍結乾燥工程中に安定化剤を添加する工程をさらに含む、請求項1～6のいずれかに記載の安定化ヒト変性リポタンパク質の製造方法。

【請求項8】 該安定化剤がシュクロース、ラクトース、トレハロース、ウシ血清アルブミン (BSA) 及びヒト血清アルブミン (HSA) からなる群より選ばれる少なくとも一種である、請求項7に記載の安定化ヒト変性リポタンパク質の製造方法。

【請求項9】 請求項1～8のいずれかに記載の方法によって製造される安定化ヒト変性リポタンパク質。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、安定化ヒト変性リポタンパク質およびその製造方法に関するものである。詳しく述べると、本発明は、ヒトリポタンパク質を変性させた変性リポタンパク質を凍結乾燥することによって長期保存安定性に優れた変性リポタンパク質およびその製造方法に関するものである。変性リポタンパク質は、心筋梗塞や狭心症などの冠動脈系疾患、脳梗塞や脳血管系痴呆などの脳動脈系疾患、あるいは腎症、糖尿病性腎症などの腎動脈系疾患および末梢動脈閉塞症のような末梢動脈系疾患などの各種循環器系疾患との関わりが強く示唆されており、その測定や生理活性の測定用の標準物質は、結果を左右する非常に重要な物質である。したがって、このようにして安定化された変性リポタンパク質は、例えば、変性リポタンパク質を認識する抗体と接触させ、該抗体の試料に対する反応性を測定することによって血液成分中に含まれる変性リポタンパク質を測定する方法において用いられる標準物質や、変性リポタンパク質の生理的役割を調べるための各種実験用の試薬および標準物質として有用である。

【0002】

【従来の技術】

心筋梗塞や狭心症などの冠動脈系疾患、脳梗塞や脳血管系痴呆などの脳動脈系疾患、あるいは腎症、糖尿病性腎症などの腎動脈系疾患および末梢動脈閉塞症のような末梢動脈系などの各種循環器系疾患は、血清中の脂質が重要な役割を担っていることは強く示唆されており、血清脂質低下薬、特にコレステロール低下薬には莫大な保健医療費が支払われている。しかしながら、最近の研究によれば、このような患者群と健常者群の比較を行なった場合、血清脂質の絶対量は両群間でそれほど大きな違いはなく、むしろその変性物である酸化LDLの血清中の存在量が明確に両群間で異なっていることが報告された（例えば、Toshima, S. et al. (1996) *Circulation*, 94, Suppl. I : 1288）。また、変性リポタンパク質の一つである酸化リポタンパク質と粥状硬化病巣の進展との関連性が、斯坦バーグ(Steinberg) らにより指摘された（例えば、Steinberg, D., Parthasarathy, S., Carew, T.E., Khoo, J.C., and Witztum, J.L., (1989) *N. Engl. J. Med.*

ed., 320 : 915)。このため、近年、変性リポタンパク質を用いた様々な測定法の開発がなされ（例えば、特開平8-304, 395号公報や特開平9-288, 106号公報）、変性リポタンパク質の生理的役割を調べるための試験の重要性が増してきている。

【0003】

しかしながら、これらの実験を行なう上で、測定のための標準物質を得ることが困難であることが事情を複雑にしてきた。即ち、変性リポ蛋白の生理的役割を調べる上では、例えば、血清中の変性リポ蛋白を複数の施設から多数集めて比較する必要があり、このためには個々の試験毎の測定値が変動しないことが必須であるが、これらの試験に必要な期間を通じて、安定で再現性のよい標準物質の存在なくしては、測定間の再現性を確保できない。また、異なる標準物質を用いることによって、測定者間の実験結果を著しく変動させることは、その生理的役割に対する解釈を複雑にし、一定の結論を得ることができない。このように安定に保存可能な標準物質が得られないことが、その生理的な重要性が指摘されながらも例えば変性リポタンパク質測定の正確な判断手段としての応用の道が閉ざされていた。

【0004】

通常、例えば、血清中のタンパク質量の測定にあたっては、いわゆる標準血清のようなものや、目的とする成分を単離した状態で、これらを何らかの方法で安定化し標準物質とすることが用いられている。リポタンパク質についていえば、例えば、リポタンパク質含有血漿または血清を、必要であれば、シュクロース等の非還元性の糖と混合して、水分含量が1～10%の範囲になるまで凍結乾燥することによって長期保存において安定な血漿または血清を製造する方法（特開平6-300, 758号公報）、アポリポタンパク質および脂質から得た再構成リポタンパク質をシュクロースやマンニトールなどの安定化剤の存在下で凍結乾燥して安定化させる安定凍結乾燥物の工業的製造方法（特開平7-242, 699号公報）が報告されていた。

【0005】

しかしながら、これらの方法によっては、いずれも安定な標準物質は調製され

ない。例えば、酸化リポタンパク質や、変性リポタンパク質をアポタンパク質から再構成する方法は未だ開示されておらず、特開平7-242, 699号公報に記載されるような方法により、変性リポタンパク質が再構成されるかどうかは定かでない。一般に変性リポタンパク質は変性によってアポタンパク質そのものが変化を受け、場合によってはペプチド鎖の切断も伴なうことから、再構成そのものが困難であることが予測され、変性リポタンパク質の標準品の製造法としては不向きである。

【0006】

また、特開平6-300, 758号公報に記述されている方法を用いて血漿中の酸化LDLを凍結乾燥前後でELISA法により測定したところ、酸化LDLの値は凍結乾燥後に約10～20倍に増大した（詳細は下記比較例を参照）ことが分かり、これから、上記方法は血清や血漿そのものを凍結乾燥する方法は不適であることが示唆された。実際に、血漿や血清中のLDLは、非凍結状態の方が凍結状態より酸化されづらいが、非凍結状態、例えば、4℃でも1ヶ月程度までしか安定でなく標準物質としての使用は困難であった。

【0007】

一方で、従来よく知られた方法により、例えば、超遠心分離法によりリポタンパク質を単離・精製し、これを銅イオン等の金属イオンで酸化させるか、無水酢酸と反応させてアセチル化する、あるいは、マロンジアルデヒド等と反応させるなどの方法で、それぞれ酸化リポタンパク質、アセチル化リポタンパク質およびマロンジアルデヒド化リポタンパク質などの変性リポタンパク質を得る方法が知られている。しかしながら、このような方法で作製した変性リポタンパク質は、未変性のリポタンパク質より不安定であり、そのままの状態では長時間の保存は不可能であった。例えば、ELISA法などで測定すると、一度調製した変性リポタンパク質の活性は4℃で2週間保存した場合で調製直後に比べて約50%の活性の低下が見られた。また、凍結して保存した場合には、逆に2週間の保存で約40%活性が増加した。

【0008】

このような状況を鑑みて、特開平9-288, 106号公報に、リン脂質を人

工的に酸化して得られたリン脂質の酸化物を血漿リポタンパク質に組み込んだ物を標準品として用いて、ヒト酸化リポタンパク質を測定する方法が開示されている。しかしながら、上記方法は抗酸化リン脂質抗体を用いて免疫化学的に変性リポタンパク質の量を測定するときにのみ有用な方法であり変性リポタンパク質のその他の測定方法や、ましてや変性リポタンパク質の生理的な作用を研究する目的に用いる標準物質としては全く適用できないという問題があった。

【0009】

このような諸事情を鑑みると、長期間安定して保存できる変性ポリタンパク質およびその製造方法が強く求められていた。

【0010】

【発明が解決しようとする課題】

したがって、本発明は、血液中の変性リポタンパク質量の測定や生理活性の測定用の標準物質として使用される、長期保存安定性に優れた（すなわち、保存期間によって測定値の変動が見られない）変性リポタンパク質およびその製造方法を提供することを目的とするものである。

【0011】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記目的を解決するべく銳意努力した結果、超遠心分離法によって分画されたリポタンパク質を銅イオン等の金属イオンで酸化させた酸化リポタンパク質、無水酢酸によってアセチル化させたアセチル化リポタンパク質あるいはマロンジアルデヒドでアルデヒド化したマロンジアルデヒドリポタンパク質等の人工的に変性させた変性リポタンパク質を凍結乾燥することによって、変性リポタンパク質の長期保存安定性を顕著に向上することができ、ゆえに、本発明の目的が解決されることを見い出した。本発明者らはまた、凍結乾燥時にシュクロース、ラクトース、トレハロース、ウシ血清アルブミン（B S A）あるいはヒト血清アルブミン（H S A）等を安定化剤として添加することによって、変性リポタンパク質の長期保存安定性をさらに向上することができ、これにより上記諸問題をより良く解決できることを見い出した。上記知見に基づいて、本発明を完成するに至った。

【0012】

すなわち、上記目的は、下記の（1）～（9）によって達成される。

【0013】

（1） ヒトリポタンパク質を人工的に変性させ、変性リポタンパク質を得、該変性リポタンパク質を凍結乾燥することにより該変性リポタンパク質を安定化することからなる安定化ヒト変性リポタンパク質の製造方法。

【0014】

（2） 前記リポタンパク質がカイロミクロン、VLDL、LDL、LP（a）、HDL2及びHDL3からなる群より選ばれる少なくとも一種である、前記（1）に記載の安定化ヒト変性リポタンパク質の製造方法。

【0015】

（3） 前記変性リポタンパク質がヒトリポタンパク質を金属イオンの存在下で酸化することによって得られる、前記（1）または（2）に記載の安定化ヒト変性リポタンパク質の製造方法。

【0016】

（4） 前記金属イオンが銅イオン、鉄イオンまたはこれらの混合物である、前記（3）に記載の安定化ヒト変性リポタンパク質の製造方法。

【0017】

（5） 前記変性リポタンパク質がヒトリポタンパク質をアセチル化することによって得られる、前記（1）または（2）に記載の安定化ヒト変性リポタンパク質の製造方法。

【0018】

（6） 前記変性リポタンパク質がヒトリポタンパク質をマロンジアルデヒドを用いてアルデヒド化することによって得られる、前記（1）または（2）に記載の安定化ヒト変性リポタンパク質の製造方法。

【0019】

（7） 凍結乾燥工程中に安定化剤を添加する工程をさらに含む、前記（1）～（6）のいずれかに記載の安定化ヒト変性リポタンパク質の製造方法。

【0020】

(8) 前記安定化剤がシクロース、ラクトース、トレハロース、ウシ血清アルブミン（B S A）及びヒト血清アルブミン（H S A）からなる群より選ばれる少なくとも一種である、前記（7）に記載の安定化ヒト変性リポタンパク質の製造方法。

【0021】

(9) 前記（1）～（8）のいずれかに記載の方法によって製造される安定化ヒト変性リポタンパク質。

【0022】

【発明の実施の形態】

以下、本発明を詳細に説明する。

【0023】

本発明の第一の概念によると、ヒトリポタンパク質を人工的に変性させ、変性リポタンパク質を得、この変性リポタンパク質を凍結乾燥することにより変性リポタンパク質を安定化することからなる安定化ヒト変性リポタンパク質の製造方法が提供される。

【0024】

本発明において使用されるヒトリポタンパク質は、細胞膜、ミトコンドリア膜、ミエリン構造膜や細菌細胞膜等の生体膜などに存在する構造リポタンパク質または血漿、卵黄やミルクなどに存在する可溶性リポタンパク質のいずれであってもよく、または、これらを超遠心分離法によって、カイロミクロン、超低密度リポタンパク質（V L D L）、低密度リポタンパク質（L D L）、リポタンパク質X、中間密度リポタンパク質（I D L）、リポタンパク質a〔L p (a)〕、H D L 2 及びH D L 3 等の高密度リポタンパク質（H D L）、及び超高密度リポタンパク質（V H D L）に分画されたものであってもよい。これらのヒトリポタンパク質は、単独で使用されてもあるいは2種以上の混合物であってもよい。これらのうち、血漿由来のカイロミクロン、V L D L、L D L、L p (a)、H D L 2 若しくはH D L 3、またはこれらの混合物、より好ましくは血漿由来のL D L が好ましい。

【0025】

本発明で使用されるヒトリポタンパク質は、ヒト正常血清から遠心沈降法や超遠心分離法等の公知の方法を用いて所定の比重を有する画分を得、この画分を透析や脱塩等の既知の方法により精製することによって調製される。例えば、低密度リポタンパク質（LDL）を調製する方法としては、以下の（1）～（3）の方法が挙げられる。

【0026】

（1）正常ヒト血清20～30mlに、エチレンジアミン四酢酸ナトリウム（EDTA-2Na）を加え、最終濃度を1mMとする。これに、NaBrを加え、比重1.000に合わせる。遠心チューブに分注し、その上にNaBrで、比重1.15、1.063、1.019及び1.006に合わせた緩衝液を順に重層し、これを4℃で24時間遠心（120,000×g）する。上端から順に分画し、各画分の比重を屈折計で測定し、比重1.019～1.063の画分をLDL画分として採取する。このようにして得られたLDL分画を、採取後直ちに、0.25mM EDTAを含むPBSで透析する（特開平7-238,098号公報、段落番号0040）；

（2）ヘパリン採血で得られたヒト血漿に最終濃度で0.25mMとなるようEDTAを加えて、その0.75mlずつを超遠心分離用試験管（1～4ml容）に採り、0.3mM EDTAを含む0.15M NaClを250μl重層して185,000×gにて10℃で2.5時間遠心する。上層150μlを捨て、下層750μlを分取して、KBr溶液（50w/v%）150μlを加えて、比重1.063とする。超遠心分離用試験管（1～4ml容）の底に比重調整した血漿を移して244,000×gにて10℃で16時間遠心する。上層の橙色バンド（約100～150μl）を注意深く回収し、0.25mM EDTAを含むPBSに対して4℃、6時間（3リットルを2時間間隔で2回交換）透析する（特開平8-304,395号公報、段落番号0050）；または

（3）EDTAを抗凝固剤として得たヒト血漿から超遠心分離法にて比重1.019～1.063の部分をLDLとして回収する。アガロース電気泳動法にて单一の鋭いバンドを得られることによりLDLの純度を確認した後、0.25mM EDTAを含むPBS溶液（pH7.4）に対して十分に透析する（特開平

9-288, 106号公報、段落番号0062)。

【0027】

また、例えば、リポタンパク質a [Lp (a)]を調製する方法の一例としては以下がある:ヘパリン採血で得たヒト血漿に最終濃度で0.25mMとなるようEDTAを加え、0.3mM EDTAを含む0.15M NaCl 250μlを重層して105,000×gにて8℃で20時間遠心する。上層を捨て、下層に予め乳鉢で粉末化したKBrを加えて、4℃にて泡立てないようにして溶解し、比重を1.125に調製し、105,000×gにて8℃で20時間遠心する。上層の橙色バンドを注意深く回収し、バイオゲルA-5mを用いて1M NaCl, 2mM EDTA, 10mM リン酸緩衝液を展開溶媒として、ゲル濾過する。得られた各フラクションをLp (a) 測定キット(テルモ株式会社製)により測定し、Lp (a) 画分を回収する。この画分をファルマシア製リジンセファロース4Bにかけ、吸着画分を0.2M ε-アミノカプロン酸を含む緩衝液により溶出させ、0.25mM EDTAを含むPBSに対して透析する(特開平8-304, 395公報、段落番号0052)。

【0028】

本発明において、ヒトリポタンパク質を人工的に変性する方法は、特に制限されるものではなく公知の方法が使用される。例えば、以下の方法が挙げられる:ヒトリポタンパク質を金属イオンの存在下で酸化する方法;ヒトリポタンパク質をアセチル化する方法;ヒトリポタンパク質をマロンジアルデヒドを用いてアルデヒド化する方法;およびリン脂質を人工的に酸化して得られる化合物(例えば、1-パルミトイール-2-(9-オキソノナノイル)-グルセロ-3-ホスホコリン及び1-パルミトイール-2-(5-オキソバレロイル)-グルセロ-3-ホスホコリン)を適当な溶媒(例えば、DMSO)に溶解した溶液を、ヒトリポタンパク質に添加する方法が挙げられる。これらのうち、ヒトリポタンパク質を金属イオンの存在下で酸化する方法;ヒトリポタンパク質をアセチル化する方法;及びヒトリポタンパク質をマロンジアルデヒドを用いてアルデヒド化する方法が好ましく使用される。

【0029】

ここで、上記好ましい3方法について以下に詳述する。

【0030】

第一に、ヒトリポタンパク質を金属イオンの存在下で酸化する実施態様について以下に詳述する。上記実施態様の一例を以下に記載する：上記したようにして調製された所定タンパク質濃度のヒトリポタンパク質（画分）に、硫酸銅（Cu SO₄）を所定濃度になるように添加し、約36～38℃で、1～24時間、反応させる。

【0031】

上記実施態様で使用される金属イオンとしては、フッ化銅（II）二水和物、臭化銅（II）、酸化銅（II）、水酸化銅（II）、硫酸銅（II）、硫酸銅（II）五水和物、セレン化銅（I）、セレン化銅（II）、セレン酸銅（II）五水和物、ヘキサフルオロケイ酸銅（II）四水和物、酢酸銅（II）一水和物、テトラアンミン銅（II）硫酸塩一水和物、及びビス（エチレンジアミン）銅（II）硫酸塩二水和物由来の銅イオン；塩化鉄（II）、臭化鉄（II）六水和物、硝酸鉄（II）六水和物、チオシアン酸鉄（II）三水和物、酢酸鉄（II）四水和物、シウ酸鉄（III）五水和物、硫酸アンモニウム鉄（II）六水和物、硫酸カリウム鉄（III）十二水和物、硫酸アンモニウム鉄（II）十二水和物、及び硫酸鉄由来の鉄イオン；ヘモグロビン（Hb）、トランスフェリン（Tf）及びラクトフェリン（Lf）の金属イオンならびにこれらの混合物が挙げられ、これらのうち、硫酸銅（II）、硫酸銅（II）五水和物由来の銅イオンまたはこれらの混合物が好ましく使用される。なお、これらの金属イオンは、単独で使用されてもあるいは2種以上の混合物の形態で使用されてもよい。

【0032】

また、上記実施態様において、金属イオンの使用量は、ヒトリポタンパク質を十分酸化できる量であれば特に制限されないが、例えば、金属イオンの濃度が、酸化されるヒトリポタンパク質1gに対して、10～200μM、好ましくは25～100μMとなるような量である。

【0033】

第二に、ヒトリポタンパク質をアセチル化する実施態様について以下に詳述す

る。上記実施態様の一例を以下に記載する：所定タンパク質濃度（約500～2000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）の上記したようにして調製されたヒトリポタンパク質（画分）の溶液に飽和酢酸ナトリウムを等容加え、0～4℃で1～2時間、攪拌する。次に、無水酢酸を0.25～4 μl （即ち、ヒトリポタンパク質に対して、0.5～2 $\mu\text{l}/\text{mg}$ ）、好ましくは0.4～2.4 μl （即ち、ヒトリポタンパク質に対して、0.8～1.2 $\mu\text{l}/\text{mg}$ ）加えて、0～4℃で60～120分間、攪拌した後、0.25 mM EDTAを含むPBS（pH 7.4）に対して2～8℃で十分（500～1000倍容で2～3回（2時間以上/回））透析する。

【0034】

第三に、ヒトリポタンパク質をマロンジアルデヒドを用いてアルデヒド化する実施態様について以下に詳述する。上記実施態様の一例を以下に記載する：0.1 M リン酸緩衝液（pH 6.5）における、所定タンパク質濃度（約0.25～1 mg/ml ）の上記したようにして調製されたヒトリポタンパク質（画分）溶液に、マロンジアルデヒド溶液（マロンジアルデヒドビスジメチルアセタール1 Mを0.1 N 塩酸存在下に100℃で5分加熱し加水分解したもの）を0.625～10 μl （即ち、ヒトリポタンパク質に対して、2.5～10 $\mu\text{l}/\text{mg}$ ）、好ましくは1～6 μl （即ち、ヒトリポタンパク質に対して、4～6 $\mu\text{l}/\text{mg}$ ）加え、30～40℃で2～4時間、反応させた後、この反応液を0.25 mM EDTAを含むPBS（pH 7.4）に対して2～8℃で十分（500～1000倍容で2～3回（2時間以上/回））透析する。

【0035】

本発明の方法は、このようにして得られた変性リポタンパク質を安定化を目的として凍結乾燥する工程を含むことを必須とする。本明細書において、「凍結乾燥」ということばは、当該分野において使用されるのと同様の意味で使用され、すなわち、試料を凍結させ、凍結状態のままで減圧して、試料から水や昇華性のものを除き、乾燥することを意味する。本発明において、凍結乾燥の条件は、変性リポタンパク質を安定化できる条件であれば特に制限されるものではないが、通常、-80～20℃、好ましくは-80～15℃の温度で、0.005～0.

1 mmHg、好ましくは0.005~0.01 mmHgの圧力で、12~72時間、好ましくは24~72時間、凍結乾燥する。

【0036】

本発明において、凍結乾燥工程中に安定化剤を添加することが好ましい。上記態様において使用される安定化剤としては、当該分野において通常使用される安定化剤が使用されるが、具体的には、シュクロース、ラクトース、トレハロース等の糖類；ウシ血清アルブミン（B S A）、ヒト血清アルブミン（H S A）等のタンパク質などが挙げられる。これらのうち、シュクロース、ラクトース、トレハロース、ウシ血清アルブミン（B S A）及びヒト血清アルブミン（H S A）が安定化剤として好ましく使用される。なお、上記された安定化剤は、単独で使用されてもあるいは2種以上の混合物の形態で使用されてもよい。

【0037】

本発明の第二の概念によると、上記態様によって製造される安定化ヒト変性リポタンパク質が提供される。

【0038】

このようにして製造されたヒト変性リポタンパク質は、長期間保存安定性に優れているので、例えば、変性リポタンパク質を認識する抗体と接触させ、該抗体の試料に対する反応性を測定することによって血液成分中に含まれる変性リポタンパク質を測定する方法において用いられる標準物質や、変性リポタンパク質の生理的役割を調べるための各種実験用の試薬および標準物質として有用である。

【0039】

【実施例】

次に、E L I S A法による変性リポタンパク質の活性測定法を例にとって、下記実施例を参照しながら、本発明による変性リポタンパク質の製造方法およびその効果についてより詳細に説明するが、本発明の概念が下記実施例に限定されるべきものでないことはいうまでもない。

【0040】

実施例 1

(1) 酸化L D Lの調製

LDLを、EDTAを抗凝固剤として得たヒト血漿から超遠心分離法（10℃で比重1.019に調整、120,000×g、20時間後、上層を回収し、1.063に比重調整し、さらに120,000×g、24時間）にて比重1.019～1.063の部分を回収することによって調製した。この際、LDLの純度は、アガロース電気泳動法にて単一の鋭いバンドが得られることにより確認した。次に、このLDL画分を、0.25mM EDTAを含むPBS（pH7.4）で十分（16時間または一晩）透析することによって精製した。次に、このようにして精製されたLDLを、LDLタンパク質濃度が1mg/mlとなるように0.25mM EDTAを含むPBS（pH7.4）に溶解し、使用するまで4℃で保存した。なお、本実施例において、タンパク質量は、Lowry modified Methodを使用した。簡潔にいうと、2%炭酸ナトリウム、0.4%水酸化ナトリウム、0.16%酒石酸、1%SDS溶液及び4%硫酸銅溶液を100対1に混合した試薬1.5mlを、サンプル及び標準物質（BSA）0.5mlに混合した。室温にて20分間反応後、フェノール試薬0.15mlを添加し、直ちに混合した。室温にて45分間反応後、660nmにおける吸光度を測定した。

【0041】

（2）LDLの酸化

（1）で調製されたLDLを、500～1000倍容以上のEDTAを含まないPBS（pH7.4）に対して3回以上（2時間以上/回）透析することによってEDTAを除去し、LDLの濃度が200μg/mlとなるようにEDTAを含まないPBS（pH7.4）に溶かした。次に、このLDL溶液10mlに、硫酸銅（CuSO₄）を終濃度が5μMとなるように添加し、37℃で3時間インキュベートした。さらに、この溶液に、EDTAを終濃度が1mMとなるように添加することにより、酸化反応を停止した後、500～1000倍容以上のEDTAを1mM含むPBS（pH7.4）で3回以上（2時間以上/回）透析することにより、CuSO₄を除去し、これを4℃で保存した。

【0042】

（3）酸化LDLの凍結乾燥品の調製

（2）で調製された酸化LDLに、BSAを終濃度2%に、及びシュークロー

スを終濃度5%になるように、それぞれ添加して、よく混和した後、ガラス瓶に1mlずつ分注し、-80℃で16時間凍結した後、20℃で、0.01mmHgの減圧下で48時間凍結乾燥することによって、水分を気化・除去させた後、密栓し、4℃で保存した。

【0043】

(4) サンドイッチELISA分析

(3) で調製された酸化LDLの凍結乾燥品に精製水1mlを加えて溶解後、1%BSAを含むPBSで6.25ng/ml及び12.5ng/mlの濃度になるように希釈し、それぞれ酸化LDL標準品(1)及び(2)とした。また、(2)で調製された酸化LDLを凍結乾燥せずにそのまま4℃で冷蔵保存されたものを、6.25ng/ml及び12.5ng/mlの濃度になるように1%BSAを含むPBSで希釈したものを比較対照とし、それぞれ、比較用酸化LDL標準品(1)及び(2)とした。

【0044】

96F マイクロプレートの各ウエルに、FOH1a/DHL3(受託番号: FERM P-14153)により產生される抗体(J. Biol. Chem 1994, 269: 15274-15279)をTris-HCl(pH8.0)で10μg/mlに希釈したものを、1μg/ウエルとなるように加えて、4℃で16時間インキュベートした。抗体溶液を捨て、1%BSAを含むTris-HCl(pH8.0)350μlを加えて室温で2時間インキュベートすることによりブロッキングした後、0.05%Tween20を含むPBS(pH7.4)で4回洗浄した。

【0045】

次に、所定期間(0、1、3、4週間)経過した後の、酸化LDL標準品(1)及び(2)、比較用酸化LDL標準品(1)及び(2)を100μlずつウエルに分注し、室温で2時間インキュベートした後、0.05%Tween20を含むPBS(pH7.4)で4回洗浄した。

【0046】

1%BSAを含むPBS(pH7.4)で1000倍に希釈されたペルオキシダーゼ標識抗ヒトアポB抗体(ヤギ)100μlを加えて、室温で30分間イン

キュベートした。次に、0.05%Tween 20を含むPBS(pH 7.4)で4回洗浄した後、o-フェニレンジアミン3mg/mlを含む0.03%過酸化水素水100μlを加えて30分間発色させた後、2N硫酸50μlを加えて反応を停止させ、492nmの吸光度を測定した。その結果を図2に示す。

【0047】

図2から示されるように、本発明による凍結乾燥された酸化LDL標準品(1)及び(2)では、調製直後(0週)に比較して測定値がほとんど変動しないのに対して、冷蔵保存された比較用酸化LDL標準品(1)及び(2)では、調製直後(0週)に比較して4週間経過後の測定値が、それぞれ、約50%及び約45%低下しており、発明による酸化LDL標準品(1)及び(2)に比して保存安定性がかなり劣ることが分かる。

【0048】

(5) 酸化LDLの凍結乾燥品を標準品として用いた検量線の作成

(3)で調製された酸化LDLの凍結乾燥品を、所定濃度(0ng/ml、6.25ng/ml、12.5ng/ml、25ng/ml、及び50ng/ml)となるように、精製水1mlを加えて溶解後、各々所定の濃度となるように1%BSAを含むPBSで希釈した。これらの溶液を、それぞれ、上記(4)と同様の操作により、492nmの吸光度を測定したところ、図1に示されるようなきれいな検量線が作成できた。

【0049】

実施例2

(1) 酸化HDLの調製

HDLを、EDTAを抗凝固剤として得たヒト血漿からLDL回収後、1.21に比重調整して超遠心分離法(10℃で120,000×g、48時間)にて比重1.063～1.21の部分を回収することによって調製した。この際、HDLの純度は、アガロース電気泳動法にて単一の鋭いバンドが得られることにより確認した。次に、このHDL画分を、0.25mM EDTAを含むPBS(pH 7.4)に対して十分(16時間)透析することによって精製した。次に、このようにして精製されたHDLを、HDLタンパク質濃度が1mg/mlとな

るよう 0.25 mM EDTA を含む PBS (pH 7.4) に溶解し、使用するまで 4°C で保存した。なお、本実施例において、タンパク質量は、Lowry modified Method を使用した。簡潔にいうと、2% 炭酸ナトリウム、0.4% 水酸化ナトリウム、0.16% 酒石酸、1% SDS 溶液及び 4% 硫酸銅溶液を 100 対 1 に混合した試薬 1.5 mL を、サンプル及び標準物質 (BSA) 0.5 mL に混合した。室温にて 20 分間反応後、フェノール試薬 0.15 mL を添加し、直ちに混合した。室温にて 45 分間反応後、660 nm における吸光度を測定した。

【0050】

(2) HDL の酸化

(1) で調製された HDL を、500~1000 倍容以上の EDTA を含まない PBS (pH 7.4) に対して 3 回以上 (2 時間以上/回) 透析することによって EDTA を除去し、HDL の濃度が 100 μg/mL となるように EDTA を含まない PBS (pH 7.4) に溶かした。次に、この HDL 溶液 10 mL に、硫酸銅 (CuSO₄) を終濃度が 10 μM となるように添加し、37°C で 18 時間インキュベートした。さらに、この溶液に、EDTA を終濃度が 1 mM となるように添加することにより、酸化反応を停止した後、500~1000 倍容以上の EDTA を 1 mM 含む PBS (pH 7.4) で 3 回以上 (2 時間以上/回) 透析することにより、CuSO₄ を除去し、これを 4°C で保存した。

【0051】

(3) 酸化 HDL の凍結乾燥品の調製

(2) で調製された酸化 HDL に、BSA を終濃度 2% に、及びシュークロースを終濃度 5% になるように、それぞれ添加して、よく混和した後、ガラス瓶に 1 mL ずつ分注し、-80°C で 16 時間凍結した後、20°C で、0.01 mmHg の減圧下で 48 時間凍結乾燥することによって、水分を気化・除去させた後、密栓し、4°C で保存した。

【0052】

(4) サンドイッチ E L I S A 分析

(3) で調製された酸化 HDL の凍結乾燥品に精製水 1 mL を加えて溶解後、

1% B S Aを含むP B Sで6. 25 n g / m l及び12. 5 n g / m lの濃度になるように希釀し、それぞれ酸化H D L標準品（1）及び（2）とした。また、（2）で調製された酸化H D Lを凍結乾燥せずにそのまま4℃で冷蔵保存されたものを、6. 25 n g / m l及び12. 5 n g / m lの濃度になるように1% B S Aを含むP B Sで希釀したものを比較対照とし、それぞれ、比較用酸化H D L標準品（1）及び（2）とした。

【0053】

96 F マイクロプレートの各ウエルに、炭酸バッファー（p H 9. 5）で10 m lに希釀された抗ヒトアポA Iヤギポリクロナール抗体を、1 μ g / ウエルとなるように加えて、4℃で16時間インキュベートした。抗体溶液を捨て、1% B S Aを含むP B S（p H 7. 4）350 μ lを加えて室温で2時間インキュベートすることによりブロッキングした後、0. 05% Tween 20を含むP B S（p H 7. 4）で4回洗浄した。

【0054】

次に、所定期間（0、1、2、3、4週間）経過した後の、酸化H D L標準品（1）及び（2）、比較用酸化H D L標準品（1）及び（2）を、それぞれ、1% B S Aを含有するP B S（p H 7. 4）で6. 25及び12. 5 μ g / m l濃度になるように希釀した。この希釀液を100 μ lずつウェルに分注し、室温で2時間インキュベートした後、0. 05% Tween 20を含むP B S（p H 7. 4）で4回洗浄した。

【0055】

1% B S Aを含むP B S（p H 7. 4）で150倍に希釀されたD L H 3抗体100 μ lを加えて、室温で1時間インキュベートした。次に、0. 05% Tween 20を含むP B S（p H 7. 4）で4回洗浄した後、1% B S Aを含むP B Sで1000倍に希釀されたペルオキシダーゼ標識抗マウスI g M抗体100 μ lを加えて、室温で30分間インキュベートした。0. 05% Tween 20を含むP B S（p H 7. 4）で4回洗浄した後、o-フェニレンジアミン3 m g / m lを含む0. 03%過酸化水素水100 μ lを加えて発色させ、30分間放置した後、2 N硫酸50 μ lを加えて反応を停止させ、492 n mの吸光度を測

定した。その結果を図4に示す。

【0056】

図4から示されるように、本発明による凍結乾燥された酸化HDL標準品(1)及び(2)では、調製直後(0週)に比較して測定値がほとんど変動しないのに対して、冷蔵保存された比較用酸化HDL標準品(1)及び(2)では、調製直後(0週)に比較して測定値が、それぞれ、約40%及び約30%低下しており、発明による酸化HDL標準品(1)及び(2)に比して保存安定性がかなり劣ることが分かる。

【0057】

(5) 酸化HDLの凍結乾燥品を標準品として用いた検量線の作成

(3) で調製された酸化HDLの凍結乾燥品に精製水1mlを加えて溶解後、1%BSAを含むPBSで所定濃度(0ng/ml、3.125ng/ml、6.25ng/ml、12.5ng/ml、25ng/ml、50ng/ml、及び75ng/ml)となるように希釈した。これらの溶液を、それぞれ、上記(4)と同様の操作により、492nmの吸光度を測定したところ、図3に示されるように、きれいな検量線が作成できた。

【0058】

実施例3

(1) 酸化Lp(a)の調製

Lp(a)を、EDTAを抗凝固剤として得たヒト血漿から超遠心分離法(15℃で120,000×g、48時間)にて比重1.060～1.125の部分を回収し、さらにバイオゲルA-5mでゲル濾過し、Lp(a)部分を回収することによって得た。この際、Lp(a)の純度は、アガロース電気泳動法にて单一の鋭いバンドを示すことによって確認した。次に、このLp(a)画分を、0.25mM EDTAを含むPBS(pH7.4)に対して十分(16時間)透析することによって精製した。次に、このようにして精製されたLp(a)を、Lp(a)タンパク質濃度が1mg/mlとなるように0.25mM EDTAを含むPBS(pH7.4)に溶解し、使用するまで4℃で保存した。なお、本実施例において、タンパク質量は、Lowry modified Methodを使用した。簡潔に

いうと、2%炭酸ナトリウム、0.4%水酸化ナトリウム、0.16%酒石酸、1%SDS溶液及び4%硫酸銅溶液を100対1に混合した試薬1.5mlを、サンプル及び標準物質(BSA)0.5mlに混合した。室温にて20分間反応後、フェノール試薬0.15mlを添加し、直ちに混合した。室温にて45分間反応後、660nmにおける吸光度を測定した。

【0059】

(2) Lp(a)の酸化

(1)で調製されたLp(a)を、500~1000倍容以上のEDTAを含まないPBS(pH7.4)に対して3回以上(2時間以上/回)透析することによってEDTAを除去し、Lp(a)の濃度が100μg/mlとなるようにEDTAを含まないPBS(pH7.4)に溶かした。次に、このLp(a)溶液10mlに、硫酸銅(CuSO₄)を終濃度が10μMとなるように添加し、37℃で18時間インキュベートした。さらに、この溶液に、EDTAを終濃度が1mMとなるように添加することにより、酸化反応を停止した後、EDTAを1mM含むPBS(pH7.4)で500~1000倍容で2~3回(2時間以上/回)透析することにより、CuSO₄を除去し、これを4℃で保存した。

【0060】

(3) 銅で酸化したLp(a)の凍結乾燥品の調製

(2)で調製された酸化Lp(a)に、BSAを終濃度2%に、及びシュークロースを終濃度5%になるように、それぞれ添加して、よく混和した後、ガラス瓶に1mlずつ分注し、-80℃で16時間凍結した後、20℃で、0.01mmHgの減圧下で48時間凍結乾燥することによって、水分を気化・除去させた後、密栓し、4℃で保存した。

【0061】

(4) サンドイッチELISA分析

(3)で調製された酸化Lp(a)の凍結乾燥品に精製水1mlを加えて溶解後、1%BSAを含むPBSで2.5ng/ml及び5.0ng/mlの濃度になるように希釈し、それぞれ酸化Lp(a)標準品(1)及び(2)とした。また、(2)で調製された酸化Lp(a)を凍結乾燥せずにそのまま4℃で冷蔵保

存されたものを、2.5 ng/ml 及び 5.0 ng/ml の濃度になるように 1% BSA を含む PBS で溶解したものを比較対照とし、それぞれ、比較用酸化 LP (a) 標準品 (1) 及び (2) とした。

【0062】

96F マイクロプレートの各ウエルに、炭酸バッファー (pH 9.5) で 10 μg/ml とされた抗アポ (a) マウスモノクロナール抗体 (1D1) を、1 μg/ウエルとなるように加えて、4°C で 16 時間インキュベートした。抗体溶液を捨て、1% BSA を含む PBS (pH 7.4) 350 μl を加えて室温で 2 時間インキュベートすることによりブロッキングした後、0.05% Tween 20 を含む PBS (pH 7.4) で 4 回洗浄した。

【0063】

次に、所定期間 (0、1、2、3、4 週間) 経過した後の、酸化 LP (a) 標準品 (1) 及び (2)、比較用酸化 LP (a) 標準品 (1) 及び (2) を、それぞれ、1% BSA を含有する 20 mM Tris-HCl 溶液 (pH 7.4) で 5 μg/ml 及び 2.5 μg/ml に希釈した。この希釈液を 100 μl ずつウエルに分注し、室温で 2 時間インキュベートした後、0.05% Tween 20 を含む PBS (pH 7.4) で 4 回洗浄した。

【0064】

1% BSA を含有する 20 mM Tris-HCl 溶液 (pH 7.4) で希釈された DLH3 抗体 100 μl を加えて、室温で 1 時間インキュベートした。次に、0.05% Tween 20 を含む PBS (pH 7.4) で 4 回洗浄した後、1% BSA を含む PBS で 1000 倍に希釈されたペルオキシダーゼ標識抗マウス IgM 抗体 100 μl を加えて、室温で 30 分間インキュベートした。0.05% Tween 20 を含む PBS (pH 7.4) で 4 回洗浄した後、o-フェニレンジアミン 3 mg/ml を含む 0.03% 過酸化水素水 100 μl を加えて 30 分間発色させた後、2N 硫酸 50 μl を加えて反応を停止させ、492 nm の吸光度を測定した。その結果を図 6 に示す。

【0065】

図 6 から示されるように、本発明による凍結乾燥された酸化 LP (a) 標準品

(1) 及び (2) では、調製直後 (0週) に比較して測定値がほとんど変動しないのに対して、冷蔵保存された比較用酸化Lp (a) 標準品 (1) 及び (2) では、調製直後 (0週) に比較して測定値が、4週間経過後では、それぞれ、約50%及び約40%低下しており、発明による酸化Lp (a) 標準品 (1) 及び (2) に比して保存安定性がかなり劣ることが分かる。

【0066】

(5) 酸化Lp (a) の凍結乾燥品を標準品として用いた検量線の作成

(3) で調製された酸化Lp (a) の凍結乾燥品を、所定濃度 (0ng/ml、0.15625ng/ml、0.3125ng/ml、0.625ng/ml、1.25ng/ml、2.5ng/ml、及び5ng/ml) となるように、精製水1ml中に溶解した。これらの溶液を、それぞれ、上記 (4) と同様の操作により、492nmの吸光度を測定したところ、図5に示されるような検量線が作成できた。

【0067】

比較例1

特開平6-300, 758号公報、実施例1に記述されている方法に準拠して、血漿を凍結乾燥して、その前後における酸化LDLを、実施例1 (4) に記載される方法と同様にして、ELISA法で測定した。その結果を、図7に示す。

【0068】

図7に示されるように、特開平6-300, 758号公報に示される方法によって調製される酸化LDLは、スクロースを安定化剤として添加して凍結乾燥した後では、凍結乾燥直前に比して約10~20倍にも増大し、再現性のある標準血漿を得ることができなかった。なお、上記結果は、酸化LDLに比べて相対的に大量に存在する未変性のLDLの酸化が凍結により促進されることによるものと考えられ、これから、特開平6-300, 758号公報に示される方法によって調製される方法は、酸化LDLの標準血漿を得る方法としては不適であることが示唆される。

【0069】

【発明の効果】

以上述べたように、本発明は、リポタンパク質を人工的に変性させて得られた変性リポタンパク質を凍結乾燥することによって得られる保存安定性に優れたヒト変性リポタンパク質およびそれを製造する方法に関するものである。変性リポタンパク質は、心筋梗塞や狭心症などの冠動脈系疾患、脳梗塞や脳血管系痴呆などの脳動脈系疾患、あるいは腎症、糖尿病性腎症などの腎動脈系疾患および末梢動脈閉塞症のような末梢動脈系疾患などの各種循環器系疾患と強く関係することが示唆されており、その測定用の標準物質や、変性リポタンパク質の生理的役割を検討するための試薬および標準物質はこれらの試験の結果を左右する非常に重要な物質である。

【0070】

したがって、本発明の方法により、保存安定性に優れた、換言すると常に一定の測定値を示す変性リポタンパク質が製造することが可能になったため、本発明による変性リポタンパク質は、例えば、変性リポタンパク質を認識する抗体と接触させ、該抗体の試料に対する反応性を測定することによって血液成分中に含まれる変性リポタンパク質を測定する方法において用いられる標準物質や、変性リポタンパク質の生理的役割を調べるための各種実験用の試薬および標準物質として有用であり、さらに、上記したような諸目的での診断技術の商品化や試薬の開発において非常に重要な影響を与えることは明白である。

【図面の簡単な説明】

【図1】 本発明の実施例1において得られた酸化LDL（銅で酸化したLDLを凍結乾燥後、所定の方法で溶解したもの）を試料として作成した検量線を示す図である。

【図2】 本発明の実施例1において得られた酸化LDL（銅で酸化したLDLを凍結乾燥したもの）を4℃で保存し、一定間隔で所定の方法で溶解したものを試料として測定した場合と、銅で酸化したLDLを凍結乾燥せずそのまま4℃で保存し、1週間おきに試料として測定した場合との測定値の比較を示す図である。

【図3】 本発明の実施例2において得られた酸化HDL（銅で酸化したHDLを凍結乾燥後、所定の方法で溶解したもの）を試料として作成した検量線を

示す図である。

【図4】 本発明の実施例2において得られた酸化HDL（銅で酸化したHDLを凍結乾燥したもの）を4℃で保存し、1週間おきに所定の方法で溶解したものを試料として測定した場合と、銅で酸化したHDLを凍結乾燥せずそのまま4℃で保存し、1週間おきに試料として測定した場合の測定値との比較を示す図である。

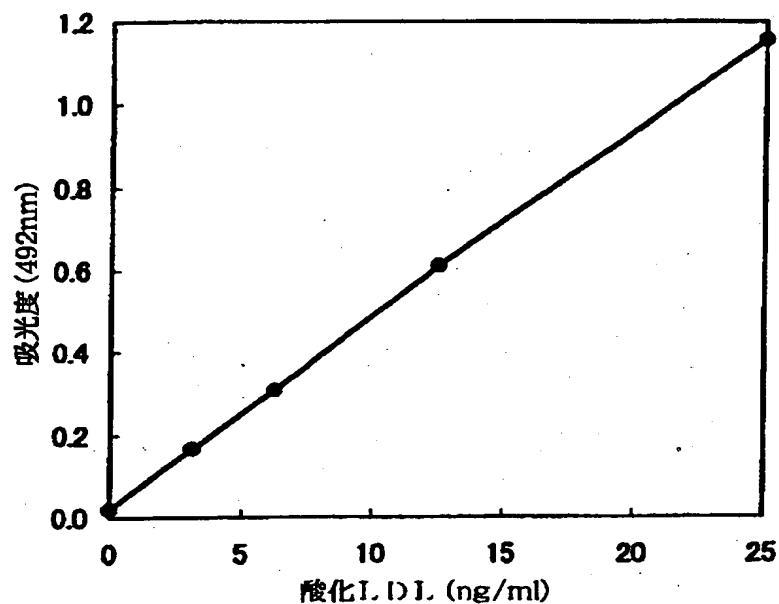
【図5】 本発明の実施例3において得られた酸化Lp(a)（銅で酸化したLp(a)を凍結乾燥後、所定の方法で溶融したもの）を試料として作成した検量線を示す図である。

【図6】 本発明の実施例3において得られた酸化Lp(a)（銅で酸化したLp(a)を凍結乾燥したもの）を4℃で保存し、1週間おきに所定の方法で溶解したものを試料として測定した場合と、銅で酸化したLp(a)を凍結乾燥せずそのまま4℃で保存し、1週間おきに試料として測定した場合との測定値の比較を示す図である。

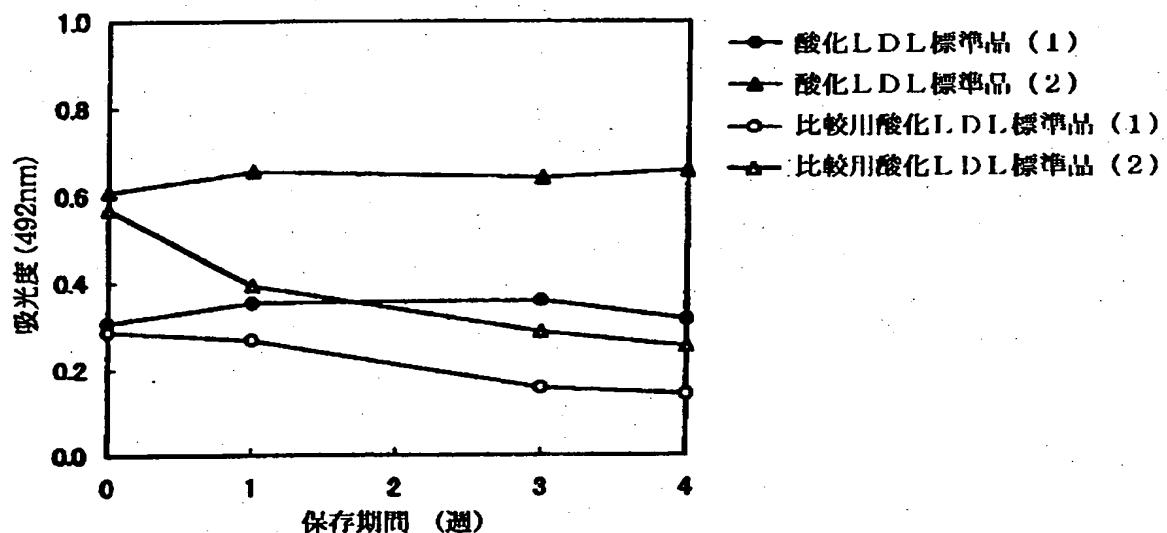
【図7】 EDTAを抗凝固剤として得たヒト血漿について、凍結乾燥前と血漿に安定化剤を添加し凍結乾燥した直後に、ELISA法にて、酸化LDLを測定した時の測定値（吸光度）の比較を示す図である。

【書類名】 図面

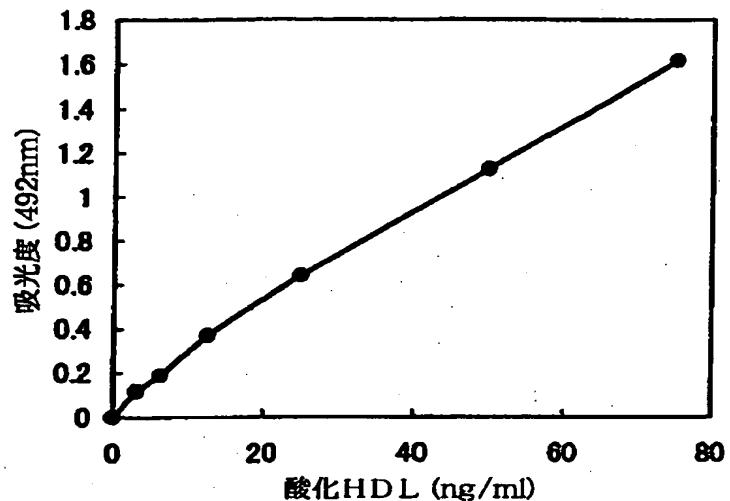
【図1】



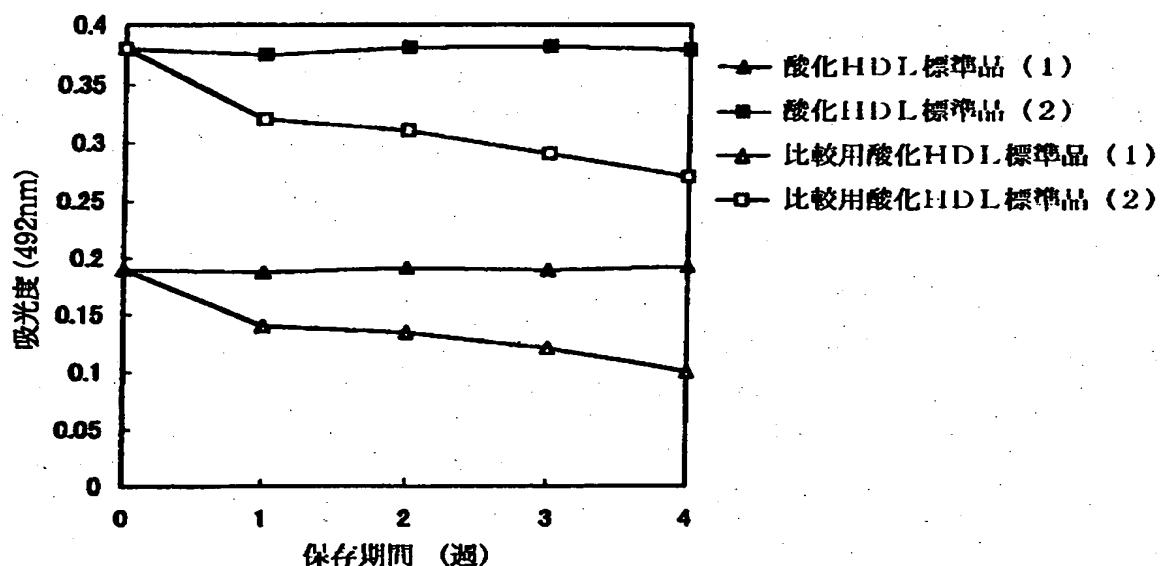
【図2】



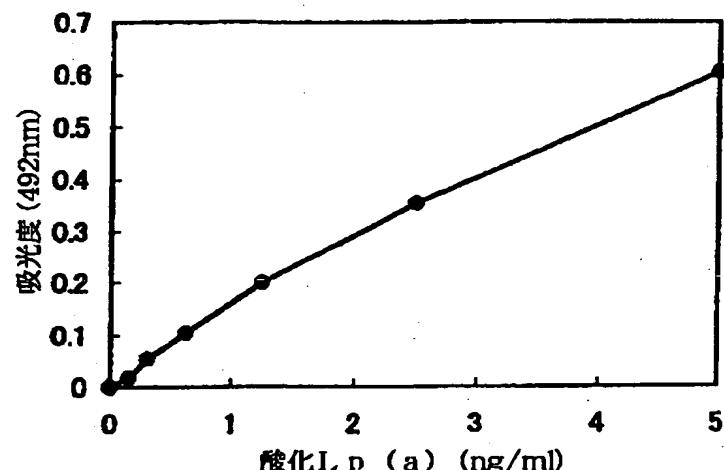
【図3】



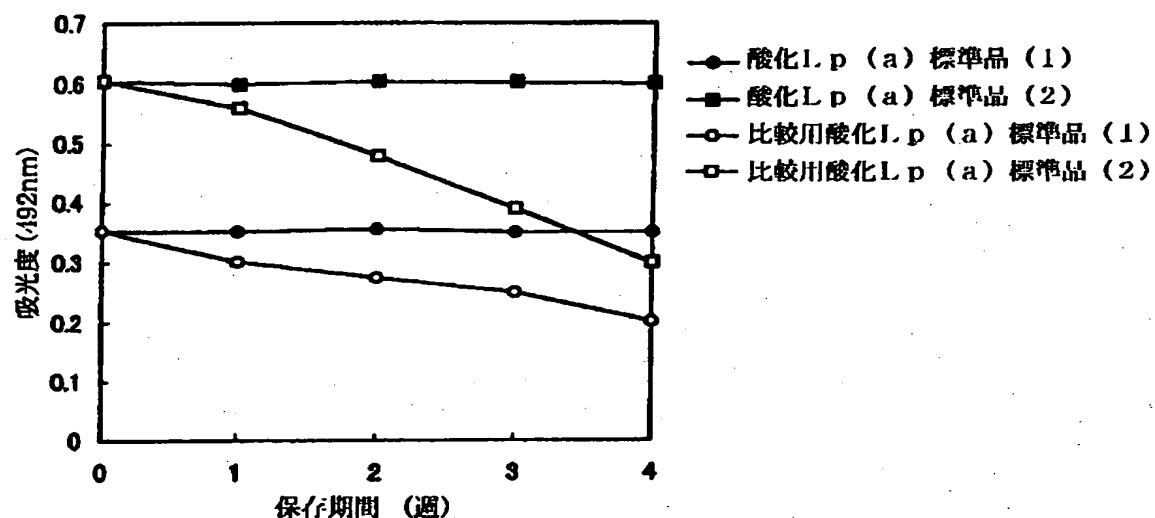
【図4】



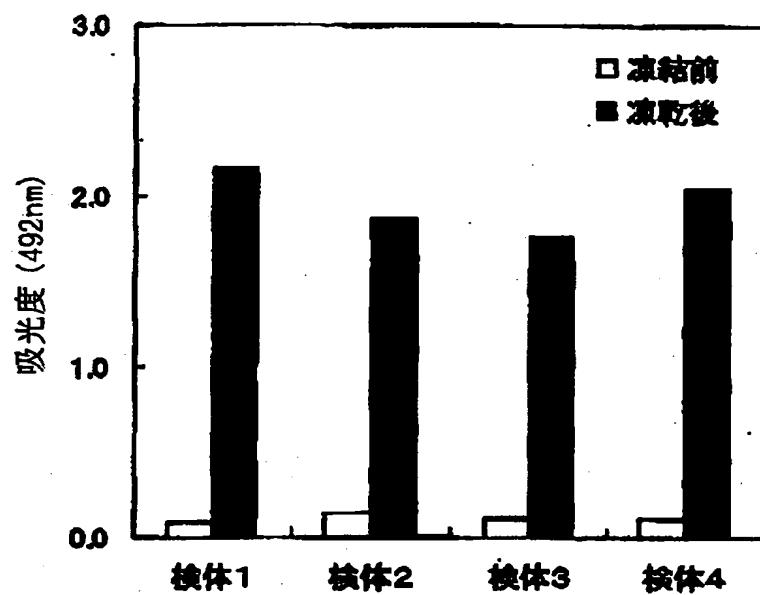
【図5】



【図6】



【図7】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 長期保存安定性に優れた（すなわち、タンパク質の変性が起こりにくい）血液中の変性リポタンパク質量の測定や生理活性の測定用の標準物質として使用される変性リポタンパク質およびその製造方法を提供する。

【解決手段】 ヒトリポタンパク質を人工的に変性させることにより得られた変性リポタンパク質を凍結乾燥することにより該変性リポタンパク質を安定化することからなる安定化ヒト変性リポタンパク質の製造方法。

【選択図】 なし

出願人履歴情報

識別番号 [592246875]

1. 変更年月日 1992年11月30日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都町田市旭町3丁目6番6号

氏 名 株式会社ベッセルリサーチ・ラボラトリー